

# LAMP法によるセラチア菌の迅速検出に関する研究

河野 彩<sup>1</sup>, 小尾信子<sup>2</sup>, 吉井美穂<sup>3</sup>, 宮原龍郎<sup>2</sup>, 落合 宏<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 富山大学医学部人間科学 I, <sup>2</sup> 同和漢診療学講座, <sup>3</sup> 同基礎看護学講座

## 要 旨

環境汚染菌の代表的存在であり、今後病院感染起炎菌としても重要と考えられているセラチア菌ではあるが、遺伝子迅速検出法の研究は少ない。このことから、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による迅速検出法の確立を試みた。プライマー設計支援ソフトにより、4種のプライマーを設計しLAMP法に応用したところ、DNA増幅は、セラチア菌8株に対してのみ認め、他4菌種（大腸菌、クレブシエラ、緑膿菌、黄色ブドウ球菌）では認められなかった。このことから、今回設計したプライマーの菌種特異性は高いことが確認された。セラチア菌液を種々希釈し、検出感度および検出時間を従来のPCR法を比較したところ、LAMP法が感度の点ではほぼ100倍高く、かつ検出に要する時間もおおよそ90分短いことが明らかにされた。これらの結果から、今回初めて開発されたセラチア菌検出用LAMP法キットは、検出特異性、感度、迅速性の点からも、臨床細菌学、感染看護の分野に有用であると考えられた。

## キーワード

LAMP法, PCR法, DNA増幅, セラチア菌, 感染看護

## はじめに

感染症は他の疾患と異なり、原因微生物が伝播していくという特殊性を有しているため、単に一個人の疾患にとどまらず、病室、病棟あるいは病院全体、さらに地域全体にまで感染が拡大し、広範囲にその影響が及ぶという可能性を持っている。これは、まさに患者にとっても、医療従事者にとっても、また医療経済からみても望ましいものではない。そのため、発症予防や早期診断、治療・患者管理など一連の感染症対策を系統的に行っていくことが求められている<sup>1,2)</sup>。

日本においては、1990年代からメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）が世界に類がない程高頻度で検出され、しかも高い死亡率がマスメディアで取り上げられた<sup>3)</sup>。その後も相次いで様々

な細菌による病院感染事例が報道され、今や病院感染が慢性的なものとして定着した感もある<sup>2)</sup>。今日においても日本の病院感染の原因菌はMRSAが最も頻度が高いが、これに対し、最近数年間にわが国でセラチア菌による特異な集団病院感染事例が大阪府、愛知県、東京都、横浜市で連続して発生している<sup>3)</sup>。

セラチア菌 *Serratia marcescens*（霊菌）は、元来病原性も弱く日和見感染菌として位置付けられていた<sup>4)</sup>。本菌は、腸内細菌科に属するグラム陰性の短杆菌で、水、土壌、食品、塵埃、動物腸管など自然界に広く分布している。セラチア属は8菌種に細分され、臨床検体から分離されるのは *Serratia marcescens* が約90%以上を占め、ついで *S. liquefaciens* とされている<sup>5)</sup>。本菌は、水に不溶の赤い色素 prodigiosin を産生するのが特徴

であるが、最近では病原性が強いとされる色素非産生株が多い傾向にあると言われている<sup>6, 7)</sup>。栄養要求性に乏しく、水分さえあれば比較的低温でも増殖するため、水回りや湿気のあるところから多く検出されている<sup>6-11)</sup>。また、タイルの目地が薄いピンク色に見えたら確実に見つかるといわれている<sup>12)</sup>。これらは、病院などで日常的に見られ、使用頻度も高い部署あるいは物品であることは注目すべきことである。

セラチアはMRSAと同じく接触感染で伝播し、菌陽性者や清潔でない病院環境から、スタッフの手や器具を介して感染する。本菌による感染症として、尿路感染症、呼吸器感染症、敗血症、創傷感染、髄膜炎、眼感染症などがあげられる<sup>4, 7, 8)</sup>。その中で特に多く見られるのは尿路感染で、抗生物質使用後および尿路カテーテル使用後に多発する。また、菌血症も静脈カテーテル、腹腔カテーテル使用後、火傷後などで起り<sup>6)</sup>、血流感染起炎菌として重要性は増している。

病院感染の感染源、感染経路を調べる方法として病原体の遺伝子塩基配列の相違識別に基づく分子疫学的手法は、強力な武器となっていることが明らかであり、Polymerase chain reaction (PCR)法はその中心的役割を担ってきた<sup>12)</sup>。しかし感染源、感染経路を調べるといういわば後ろ向きの調査に対して、現在まさに起きているアウトブレイクの起炎菌を把握することは、前向き調査として必要不可欠であると考えられる。そのためには、迅速性を備えた調査法の開発が期待されていた。このような中で、2000年に納富らによって新しい遺伝子増幅法としてLoop-mediated isothermal amplification (LAMP)法<sup>13)</sup>が報告された。その後、この方法の優れた迅速性、特異性、簡便性が立証され、現在では、SARSコロナウイルス、レジオネラ菌、サルモネラ菌、腸管出血性大腸菌、ペロ毒素、大腸菌O-157などを検出するキットが開発されている<sup>14)</sup>。しかし、院内感染の原因菌として近年注目されているセラチア菌に関してはまだ開発されていない。

このような背景のもと、本研究ではセラチア菌を対象として、LAMP法迅速検出キットの開発を試み、従来からのPCR法と比較検討した。

## 材料と方法

### 1. 供試菌とその培養

セラチア菌は、新潟大学農学部仲川洋治先生、及び同大学医学部保健学科寺尾通徳先生より分与を受けた臨床材料由来の色素産生株4株と色素非産生株4株の計8株を用いた。セラチア菌以外では、グラム陰性菌として大腸菌(ATCC3630)、緑膿菌(ATCC27853)とクレブシエラ(TMPU-K12)、またグラム陽性菌として黄色ブドウ球菌(ATCC25923)とMRSA(TMPU 37)を用いた。これらの菌株は、ミューラー・ヒントン・ブロース(MHB, DIFCO)を液体培地として使用し、37℃で一晩培養して使用した。得られた新鮮培養液の一部は、その1  $\mu$ lに80%グリセロール250  $\mu$ lを加え-80℃で凍結保存した。

### 2. 菌からのDNA抽出

液体培地を用い、37℃で一晩培養した菌液をTE緩衝液(TEB:10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)を用いて適宜希釈した。これらを95℃、5分間の加熱処理後、氷冷して、12,000 rpm、4℃、10分間の遠心した。得られた上清1  $\mu$ lをDNA溶液として下記に示したLAMP法あるいはPCR法に用いた。

### 3. LAMP法<sup>13)</sup>

LAMP法プライマー設計支援ソフトを用いて、4種類のプライマー、FIP、BIP、F3およびB3を設計した。このうち、F3とB3は、増幅させる標的遺伝子領域の両外側端領域より設計されたouter primerである。FIPは、F3より内側領域であるF1とF2領域、またBIPは、B3より内側領域であるB1とB2領域から設計されたinner primerである。氷上で、エッペンドルフチューブに抽出された菌DNA、4種プライマー、鎖置換型DNA合成酵素、2×反応混合液に蒸留水を加え計25  $\mu$ lとし、Loopampリアルタイム濁度測定装置RT-160C(栄研化学)にて、63℃の一定反応温度でDNA増幅を行った。増幅産物の経時的变化を、同装置により副産物として生じるピロリン酸マグネシウムによる白濁を吸光度グ

ラフとしてリアルタイムに観察し、最終的には肉眼的にも白濁の有無を確認した。

感度試験においては、セラチア菌懸濁液をTEBを用いて6 colony forming unit (cfu)/test $\sim 6 \times 10^4$  cfu/testの5段階の10倍希釈系列を作製し、それぞれの希釈菌液よりDNAを抽出しその1  $\mu$ lをLAMP法に用いた。

特異性試験においては、セラチア菌懸濁液は約 $6 \times 10^3$  cfu/testに希釈し、セラチア菌以外の菌の菌懸濁液は、約 $6 \times 10^5$  cfu/testとしてDNA溶液を作製し検体として用いた。

#### 4. PCR法

全ての菌から抽出したDNAを用いてPCR反応を行った。PCR法に用いたセラチア菌遺伝子特異的プライマーは、既報に基づき設定した<sup>15-18)</sup>。

PCRの条件は、初回のみ94℃、5分の熱変性を行い、続けて変性94℃、30秒、アニーリング55℃、30秒、伸長72℃、1分を25サイクル行い、

72℃、7分の後、4℃で保存した。反応終了後、サンプル10  $\mu$ lを2%アガロースゲルにて電気泳動(100V, 50分)し、エチジウムブロマイド染色後トランスイルミネーターで増幅産物のバンドを確認し、写真撮影した<sup>18)</sup>。

## 結 果

### 1. LAMP法とPCR法の比較

#### 1) 測定時間

抽出DNAの前処理に、いずれの菌あるいはサンプルにおいても約30分を必要とした。LAMP法とPCR法の測定時間を比較するために、セラチア菌液をTEBで約 $6 \times 10^3$  cfu/testに希釈後抽出したDNAを用い増幅反応をLAMP法とPCR法で行った。その結果、LAMP法では約60分以内に増幅産物であるピロリン酸マグネシウムの白濁を検出することができた。PCR法においては、反応時間に約100分、電気泳動に約50分、さらに反応の確認には、紫外線下でみる必要があり、特異的な増幅バンドを確認するのに約150分必要とした。その結果、遺伝子増幅を確認するまでの全過程において、LAMP法では約90分、PCR法では約180分を必要とし、LAMP法が90分短いという結果を得た。両法の時間的比較を図1に示した。

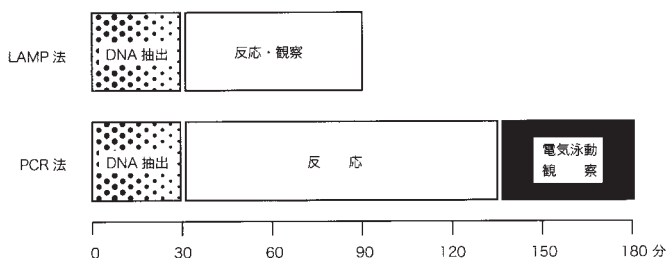


図1 LAMP法とPCR法の検出時間の比較

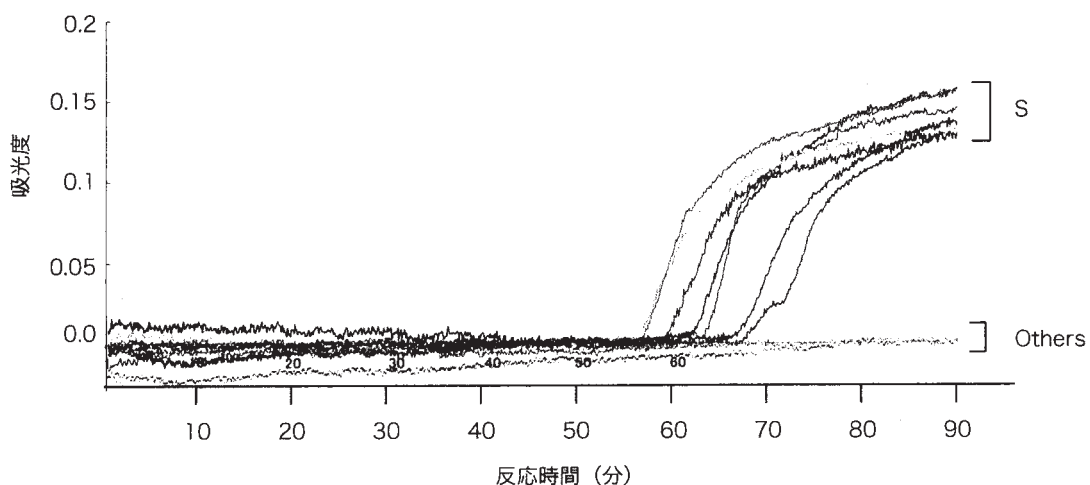


図2 設計プライマーのセラチア菌DNA検出特異性の検討 ～LAMP法～

S：セラチア菌供試8株

Others：黄色ブドウ球菌、大腸菌、クレブシエラ、緑膿菌、MRSA

## 2) 設計プライマーのセラチア菌に対する特異性

### (1) 菌種別 DNA による検討

セラチア菌として色素産生株4株と色素非産生株4株、計8株を用い、またセラチア菌以外の菌として大腸菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、クレブシエラおよびMRSAの5菌種5株も用い、それぞれの菌から抽出したDNAについて、LAMP法とPCR法を行った。図2に示したように、LAMP法では、セラチア菌8株の全てで、60分前後から吸光度グラフの上昇を認め、反応後に増幅産物による白濁を肉眼的に確認できた。しかしながら、大腸菌、緑膿菌、クレブシエラ、黄色ブドウ球菌およびMRSAの5菌種5株においては、90分経過しても吸光度グラフの上昇、増幅産物

による白濁を確認することができなかった。

PCR法においては、図に示さなかったが、セラチア菌8株の増幅バンドは検出できたが、それ以外の大腸菌、緑膿菌、クレブシエラ、黄色ブドウ球菌およびMRSAの5菌種5株菌では、増幅バンドは検出できなかった。

### (2) セラチア菌 DNA に他菌 DNA を混合した場合

セラチア菌液（由来DNAにセラチア菌以外（黄色ブドウ球菌、大腸菌あるいは緑膿菌）由来DNAを混合しLAMP法を行い、その結果を図3に示した。

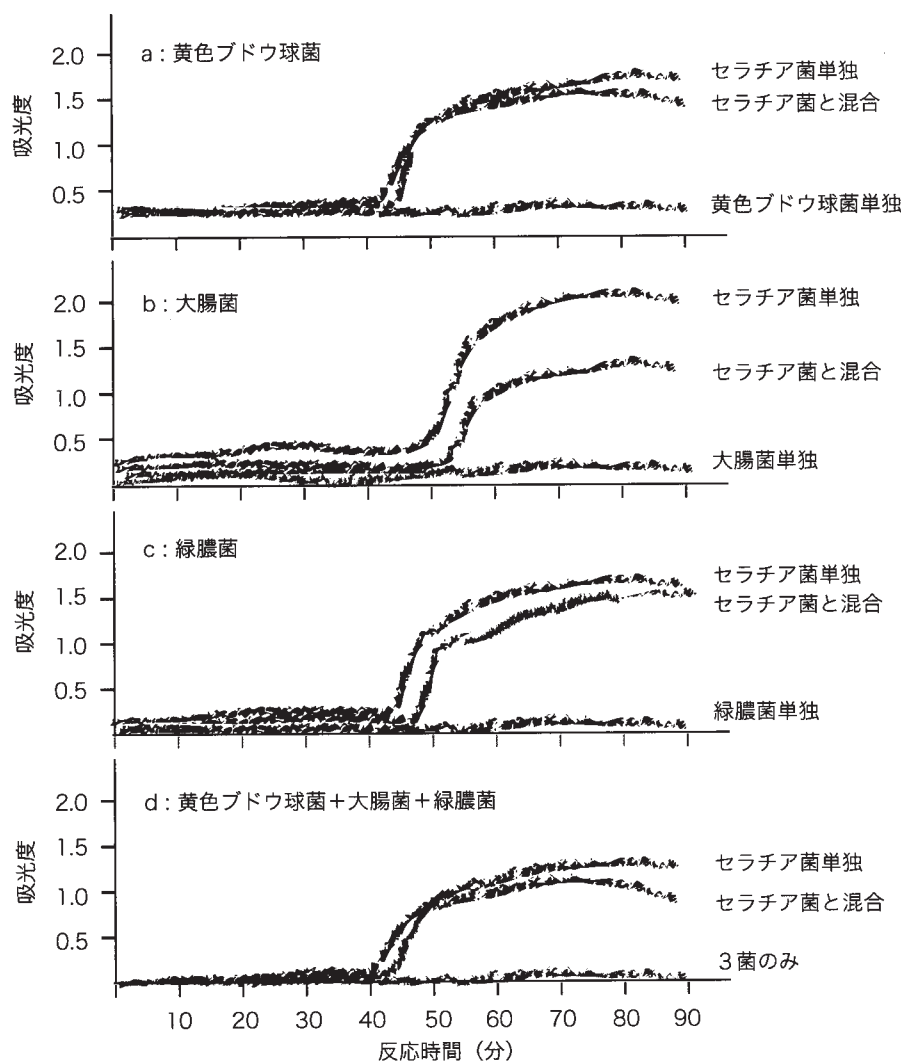


図3 LAMP法の特異性の検討～セラチア菌DNAと他菌DNAを混合させた場合～



### ①黄色ブドウ球菌DNAを混合した場合(図3a)

セラチア菌DNA単独, セラチア菌DNAと黄色ブドウ球菌DNA混合および黄色ブドウ球菌DNA単独の3者をLAMP法にかけたところ, セラチア菌DNA単独およびセラチア菌DNAと黄色ブドウ球菌DNAの2サンプルのみ, 40分あるいは45分から吸光度グラフの上昇を認め, ほぼ60分にプラトーに達する増幅産物による白濁が確認できた。しかしながら, 黄色ブドウ球菌DNA単独のサンプルからは, 90分においても吸光度グラフの上昇, 増幅産物による白濁を確認することができなかった。

### ②大腸菌DNAを混合した場合(図3b)

セラチア菌DNA単独, セラチア菌DNAと大腸菌DNA混合および大腸菌DNA単独の3者をLAMP法にかけたところ, セラチア菌DNA単独およびセラチア菌DNAと黄色ブドウ球菌DNAの2サンプルのみ, 50分から検出されはじめ, ほぼ70分にプラトーに達する増幅産物による白濁が確認できた。しかしながら, 大腸菌DNA単独のサンプルからは, 90分においても吸光度グラフの上昇, 増幅産物による白濁を確認することができなかった。

### ③緑膿菌DNAを混合した場合(図3c)

セラチア菌DNA単独, セラチア菌DNAと緑膿菌DNA混合および緑膿菌DNA単独の3者をLAMP法にかけたところ, セラチア菌DNA単独およびセラチア菌DNAと緑膿菌DNAの2サンプルのみ, 50分から検出されはじめ, ほぼ70分にプラトーに達する増幅産物による白濁が確認できた。しかしながら, 緑膿菌DNA単独のサンプルからは, 90分においても吸光度グラフの上昇, 増幅産物による白濁を確認することができなかった。

### ④黄色ブドウ球菌, 大腸菌および緑膿菌3菌種DNAを時に混合した場合(図3d)

セラチア菌DNA単独, セラチア菌DNAと3種の菌DNAの混合, 3種の菌DNAの混合の3者をLAMP法にかけたところ, セラチア菌DNA

単独およびセラチア菌DNAと3菌DNAの混合サンプルのみから40分あるいは45分から検出されはじめ, ほぼ60分にプラトーに達する増幅産物による白濁を確認した。しかし, セラチア菌DNAを含まない3菌種DNAサンプルからは, 90分においても吸光度グラフの上昇, 増幅産物による白濁を確認することができなかった。

上記のように, セラチア菌由来DNAを含むサンプルのみから増幅産物が検出でき, セラチア菌以外の大腸菌, 緑膿菌, クレブシエラ, 黄色ブドウ球菌およびMRSA由来DNA単独あるいはそれらの混合液からは検出できなかったことから, 今回設計したプライマーは, 特異性の面で満足できるものと考えられた。

### 3) 検出感度

セラチア菌懸濁液をTEBを用いて, 6 cfu/test $\sim$ 6 $\times$ 10<sup>4</sup> cfu/testの5段階の10倍希釈系列を作製し, 各希釈段階から抽出したDNAを用いLAMP法を行うと, 図4aに示したように, 60分以内に6 cfu/testまですべての希釈段階から吸光度グラフの上昇, 増幅産物による白濁を確認することができた。但し, 増幅反応進行の遅速は希釈段階に依存して, 最も希釈段階の低い6 $\times$ 10<sup>4</sup> cfu/testでは, 40分に吸光度グラフの上昇が観察され, 6 $\times$ 10<sup>3</sup> cfu/test, 6 $\times$ 10<sup>2</sup> cfu/test, 6 $\times$ 10<sup>1</sup> cfu/test, 6 cfu/testでは, グラフの上昇の確認に要した時間はそれぞれ41分, 45分, 46分と53分であった。一方図5に示したように, PCR反応においては, 6 $\times$ 10<sup>4</sup> cfu/test, 6 $\times$ 10<sup>3</sup> cfu/testおよび6 $\times$ 10<sup>2</sup> cfu/testでは増幅バンドが検出できたものの, 6 $\times$ 10<sup>1</sup> cfu/testと6 cfu/testでは増幅バンドを検出することができなかった。LAMP法においては6 cfu /test, PCR法においては600 cfu /testが検出限界であったことから, 検出感度においてLAMP法が, PCR法よりも少なくとも100倍は優れていることが示唆された。

図4bのLAMP法と図5のPCR法の電気泳動のゲル上に観察される増幅バンドパターンにも, 両法の相違は反映し, LAMP法では, 反応時間に形成されたループ数に依存して異なる塩基長を

LAMP 法によるセラチア菌の迅速検出

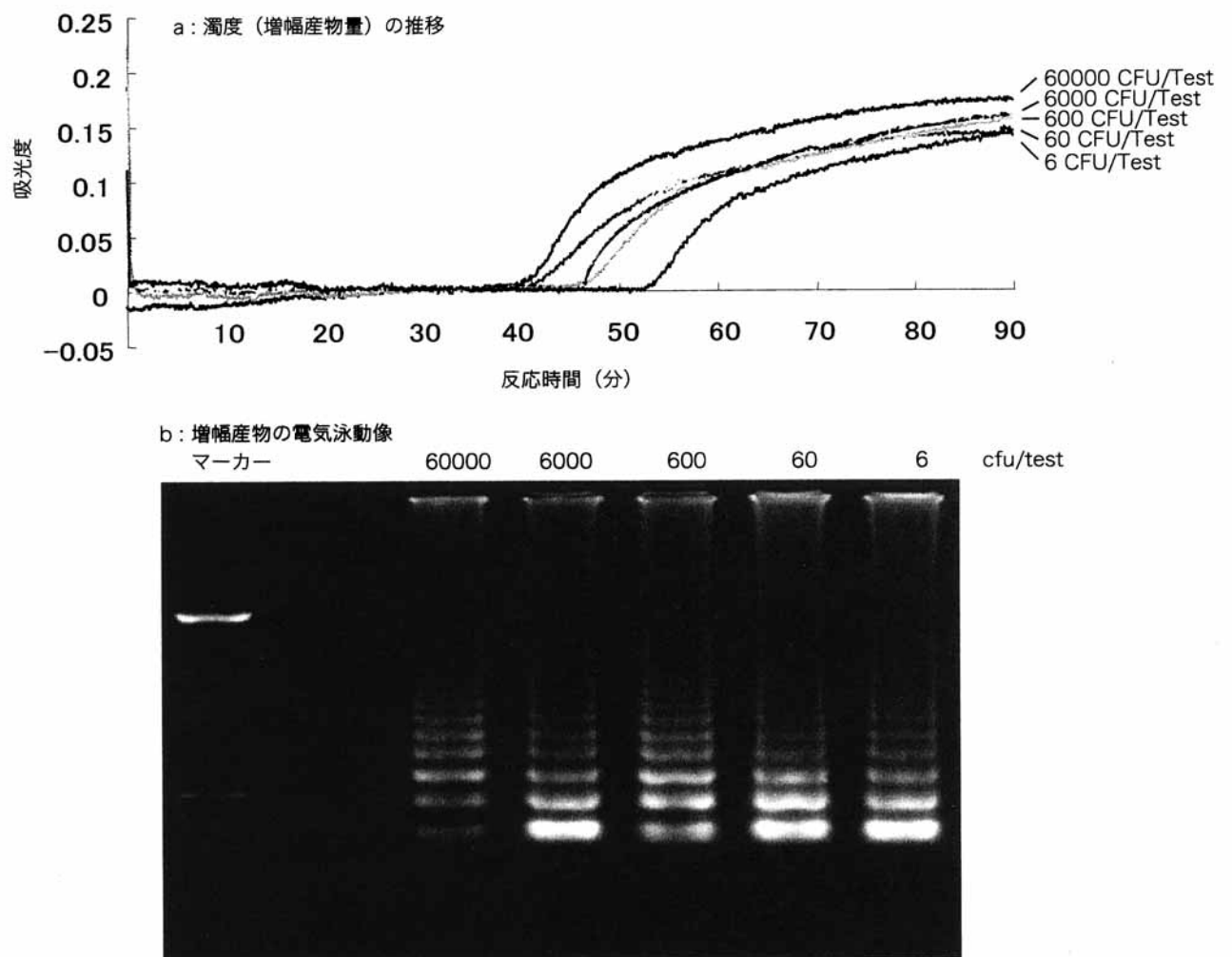


図4 検出感度の検討 ～LAMP 法

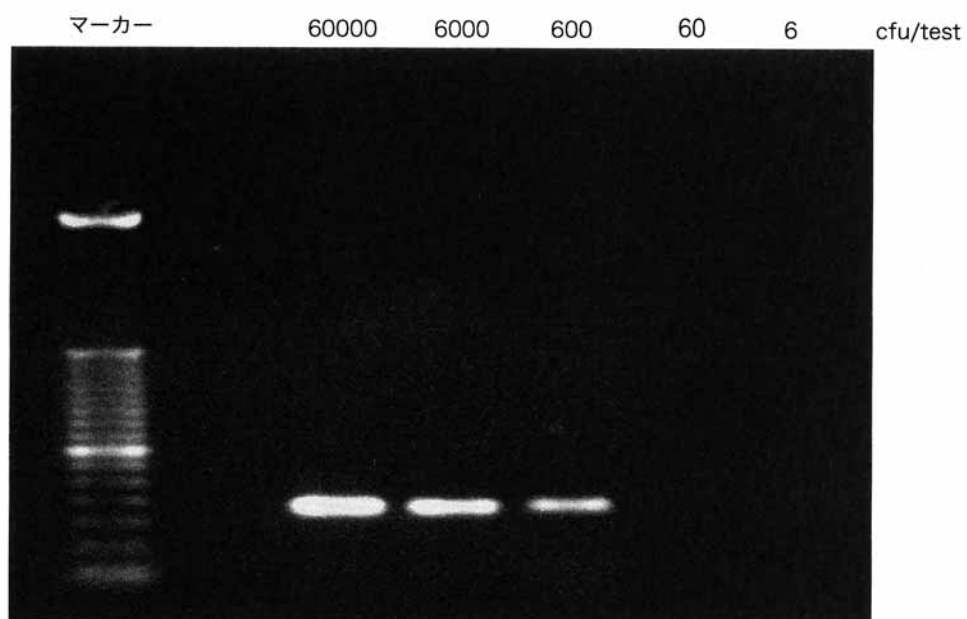


図5 検出感度の検討 ～PCR 法～

もった増幅産物がラダー状に観察されたが、一方PCR法では、179塩基長の単一バンドとして観察された。

## 考 察

病院感染として、ある微生物によるアウトブレイクが起きた際、感染源や感染経路の特定のための方法には、血清型、薬剤感受性パターン、フェージ型などの表現型別とDNAあるいはRNAの塩基配列に基づく遺伝子型別（分子疫学的手法）がある<sup>12,18,19</sup>。この分子疫学的手法についての検証は、上田らが分子疫学的手法であるRandom amplified polymorphic DNA PCR（RAPD-PCR）法がセラチア菌院内感染アウトブレイク発生時の汚染源・伝播経路追求法として、感染看護への導入の面からも極めて有用であることを報告している<sup>18</sup>。さらに、迅速性に優れた起炎菌の同定、検出法が加味されればより万全な体制が確立するものと思われる。しかしながら、迅速性に視点を当てた研究は少ない。本研究ではセラチア菌を対象として、簡便・迅速・正確・高い特異性という特徴を兼ね備えたLAMP法を用いて、セラチア菌汚染の迅速検出について検討した。

多様な臨床材料からの起炎菌の検出に関しては、従来から材料の直接塗抹標本のグラム染色により菌種を推定し、培養菌の諸性状から同定するという方法がとられていた。しかし血液培養などでは少なくとも数日、ウイルスに至っては数週を要するという現状があった。この欠点を補うものとして遺伝子検出法が開発されてきた<sup>12,18,19</sup>。遺伝子検出法においては、検体に存在する病原体の遺伝子量は、通常極めて僅かなため、いかに効率よく遺伝子を増幅するかが最も重要なポイントとなる。現在、広範な分野で用いられ不可欠な技術として広く普及している遺伝子増幅法はPCR法であり、実際2つのプライマーがあれば増幅可能である利点の反面、反応には温度を段階に調整する装置が必要であり、増幅産物の確認にはゲル電気泳動や、別途プローブなどを用いた検出反応を行わなければならない。このような中、納富らによって新しい遺伝子増幅法としてLAMP法が報告された<sup>13</sup>。LAMP法の特徴として、①一定温度で増幅反応

が進行②高い特異性③迅速、高い増幅効率（高感度）④簡易検出が可能であることが挙げられる。またLAMP法は増幅反応が一定の温度（60～65℃）で進行する酵素を用いるため、PCR法のような高価な温度制御機器は必要とせず、一定温度を保持できるウォーターバスなどがあれば反応を行うことができる<sup>19-25</sup>。実際、本研究においても、1段階の操作で済むLAMP法に対して5段階の操作を要したPCR法、また検出時間もLAMP法ではPCR法のそれよりも90分短縮と、LAMP法の簡便性と迅速性を確認することができた。このようなLAMP法の優れた簡便性と迅速性をもたらす要因として、1つには増幅産物の検出系が考えられた。検出系として、LAMP法においては副産物として生じるピロリン酸マグネシウムによる白濁を観察する方法が採用されており<sup>19-25</sup>、煩雑なPCR法（電気泳動後、エチジウムブロマイドと紫外線照射による可視化）とは著しく異なっている<sup>18</sup>。しかも今回、Loopampリアルタイム濁度測定装置導入により、白濁形成過程を吸光度としてリアルタイムに観察できたことにより、簡便性と迅速性が一段と高まったものと考えている。

LAMP法の独自の増幅産物の検出系よりもたらされた簡便性、迅速性に加え、さらに本法を、特異性と検出感度の面から特徴付けたものが、プライマーの設計にあるものと考えられた。今回、セラチア菌遺伝子の塩基配列データベースを基に、プライマー設計支援ソフトを用い6領域を認識する4種類のプライマー、FIP、BIP、F3およびB3を作成した。このうち、増幅領域両端でループを形成し、それを起点に増幅産物が反復伸長してゆくというLAMP法最大の特徴を付与するのがFIPとBIPの2種類のプライマーである。即ち、FIP（BIP）は、F1（B1）とそれよりも外側領域のF2（B2）を含むプライマーであり、F1（B1）はDNA2本鎖のもう1本の相当領域と相補的塩基配列をもつことからループ形成が起こる。一方、F3とB3の2種類のプライマーは、増幅領域の両末端を規定するという意味で、PCR法に用いる2種類のそれに相当するものであり<sup>13</sup>、これらのプライマーからのDNA伸長が同時に起こることにより、FIP（BIP）プライマーからの増

幅効率を高めていると考えられた。このようなプライマー設計の特徴を反映して、遺伝子検査をする上での最も重要なポイントである特異性と感度（遺伝子の増幅効率）において、PCR法より格段と優れているとされている<sup>19-25)</sup>。

今回設計したプライマーが、LAMP法の測定原理に合致し、その特徴を反映しうるものか、特異性と測定感度の面から検討した。特異性試験において、セラチア菌由来DNAを含むサンプルのみから増幅産物が検出でき、セラチア菌以外の大腸菌、緑膿菌、クレブシエラ、黄色ブドウ球菌およびMRSA由来DNA単独あるいはそれらの混合液からは検出できなかった。またデータには示していないが、レジオネラ検出キットに含まれていたレジオネラ菌DNAにおいても同様の陰性結果を得ている。このことから、セラチア菌以外の菌種は分類学的には5種と少ないが、今回設計したプライマーは、セラチア菌に対する特異性は満足できるものであると考えられた。次に検出感度の問題であるが、LAMP法では、標的となる鋳型DNAを15～60分で $10^9 \sim 10^{10}$ 倍程度に増幅することが可能であり、その効率はPCR法の $10^3$ 倍に及んでいるとされている<sup>19-25)</sup>。今回設計したLAMP法プライマーの感度を検討するために、DNAを抽出菌量を6 cfu/test $\sim 6 \times 10^4$  cfu/testの5段階を作製した。その結果、増幅産物である白濁の検出時間は菌量に依存していたものの、最終的には6 cfu /testという極めて少量のサンプルからでも60分以内に検出することができた。一方、PCR法においては600 cfu /testが検出限界であった。このことから、LAMP法の方がPCR法よりも少なくとも100倍は感度が優れていると考えられた。さらに、増幅産物の電気泳動パターンにみられたラダー形成は、設計プライマーが、適切にループを形成していることの証拠としてとることができる。これらの結果を総合して、LAMP法の測定原理を満足し、その特徴を反映できるプライマーが設計できたと考えている。

現在、病院感染が起こったときの迅速診断やさまざまな疫学調査を主に行っているのは、臨床検査部であることが多い。高度化、専門化してきている医療分野において、看護職の役割も広がり

を見せており、より多くの知識、技術を習得することが求められてきている。このような中で、感染管理看護師（ICN）の役割として、疫学調査などへの積極的な協力も今後より求められてくると考えられる。また、病院の感染対策としては、医師や看護師、薬剤師、検査技師などが構成のメンバーとなる感染対策チーム（ICT）が中心となって行っているが、その中で患者に接する機会が多く、現場に精通している看護師には、感染管理において中心的な役割を担うことが求められており、それらを行うことで病棟全体の感染管理の意識の向上へとつながり、看護の質を高めることにもなると考えられる。LAMP法の原理は一見複雑ではあるが、方法は簡便であり、反応の有無も確認しやすいため、看護への導入も可能であると考えられた。今後、セラチア菌検出法のキット化に加え、他菌への応用拡大が展開されることに期待したい。

## 謝 辞

使用した菌株の分与を賜りました新潟大学農学部仲川洋治先生、及び同大学医学部保健学科寺尾通徳先生に深く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) 賀来満夫：欧米における感染制御—わが国との比較—，泌尿器外科 17（5）：367-371，2004.
- 2) 賀来満夫：21世紀における感染制御，医学検査 51（4）：303，2002.
- 3) 増田剛太：セラチアを原因とする院内感染症の集団発生 臨床検査 46（7）：777-779，2002.
- 4) 川名林冶：セラチア（*Serratia marcescens*）感染症について，臨床と微生物 27（5）：562-563，2000.
- 5) 奥住捷子，小栗豊子：感染管理に役立つ病原微生物のツボ，INFECTION CONTROL 13（7）：751-756，2004.
- 6) 水口康雄，中山宏明，南嶋洋一：ナースのた



- めの微生物学：南山堂（東京），2003.
- 7) 藪内英子：セラチア属菌，細菌学（林英生，竹田美文編）：384-387，朝倉書店（東京），2002.
  - 8) 安藤智恵 向野賢治：セラチア INFECTION CONTROL 7（7）：62-65，1998.
  - 9) 向野賢治：16事例からみるセラチアの病院感染—アウトブレイクを防ぐために—，INFECTION CONTROL 9（13）：75-80，2000.
  - 10) 大田豊隆，松本久，白井俊由，玉城博行，亀井亜希子，出石依子，澤村雅美，池田信明：耳原総合病院でのセラチア病院感染問題と改善点.INFECTION CONTROL 10（7）：58-62，2001.
  - 11) 藤井逸人：医療施設におけるセラチア菌感染集団発生事例の疫学調査，IRYO 59（1）：38-40，2005.
  - 12) 満田年宏：分子疫学ってナンダ！INFECTION CONTROL 10（4）：88-96，2001.
  - 13) Notomi T, and Okayama H：Loop-mediated isothermal amplification of DNA，Nucleic Acids Research 28（12）：e63 i -vii，2000.
  - 14) 安中敏光：LAMP法による Legionella 属菌の検出 JARMAN 14（1）：25-30，2003.
  - 15) Iwaya A, Nakagawa S, Iwakura N, Taneike I, Hatakeyama K and Yamamoto T：Nosocomial outbreak-derived *Serratia marcescens*: Rapid and quantitative detection of the agent in the blood by a real time PCR assay, Acta Medica et Biologica 50（4）：185-190 2002.
  - 16) Iwaya A, Nakagawa S, Iwakura N, Taneike I, Kurihara M, Kuwano T, Gondaira F, Endo M, Hatakeyama K, Yamamoto T：Rapid and quantitative detection of blood *Serratia marcescens* by a real-time PCR assay: Its clinical application and evaluation in a mouse infection model FEMS Microbiology Letters 248（6）：163-170，2005.
  - 17) Patton PG, Katz S, Sobieski RJ, Cruppet SS: Genotyping of clinical *Serratia marcescens* isolates: a comparison of PCR-based methods. FEMS Microbiol. Letters 194:19-25, 2001.
  - 18) 上田京佳，佐藤美友紀，片田裕子，今西信子，落合宏：分子疫学的手法によるセラチア菌の識別とその精度に関する研究～ICNへの導入の視点から～，富山医科薬科大学看護学会誌6（1）：27-44，2005.
  - 19) 猪狩淳：院内感染と遺伝子検査，臨床と微生物 26：185-186，1999.
  - 20) 牛久保宏：LAMP法の原理—遺伝子の簡易・迅速な増幅法—，ウイルス 54（1）：107-112，2004.
  - 21) Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T：Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. Clin. Chem. 47（9）：1742-1743，2001.
  - 22) Mori Y, Nagamine K, Tomita N, and Notomi T：Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Bioch. Biophys. Res. Commun. 289：150-154，2001.
  - 23) 槇村浩一，藤崎竜一：新規遺伝子検査法 LAMP法と真菌症対策への応用の可能性，最新医学 58（6）：69-73，2000.
  - 24) 神田秀俊，納富継宣：LAMP法による遺伝子の簡易・迅速増幅 医学のあゆみ 206（8）：470-475，2003
  - 25) 納富継宣：LAMP法 新しい遺伝子増幅法 臨床検査 46（3）：320-323，2002.

## Development of loop-mediated isothermal amplification method for the detection of *Serratia mercescens*

Aya KOHNO<sup>1</sup>, Nobuko OBI<sup>2</sup>, Miho YOSHII<sup>3</sup>, Tatsuro MIYAHARA<sup>1</sup> and Hiroshi OCHIAI<sup>1</sup>

Departments of Human Science<sup>1</sup>, Oriental Medicine<sup>2</sup>, and Foundamental Nursing<sup>3</sup>, Faculty of Medicine, University of Toyama, Sugitani 2630, Toyama 930-0194, Japan

### Abstract

We attempted to establish the loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) suitable for the detection of *Serratia mercescens*, a representative environmental and nosocomial infection-related bacteria, comparing with polymerase chain reaction method (PCR). LAMP-supporting software was used to enable us to construct a primer set (PrS) consisting of 4 primers. The species-specificity of constructed PrS was confirmed by the trial LAMP in which DNA amplification was only positive in 8 strains of *Serratia* (*S.*) *mercescens*, but negative in other bacteria species (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*). The sensitivity assay using various numbers of *S. mercescens* showed that LAMP is superior at least 100-fold to PCR for the detection of DNA amplification. In addition, times required for its detection were shorter almost 90 min in LAMP than PCR. These data indicate that LAMP system suitable for the detection of *S. mercescens* is established for the first time in this study and its application on the clinical microbiology and infection control nursing might be useful from the aspects of simplicity, rapidity, sensitivity, specificity and time-consumption.

### Key words

loop-mediated isothermal amplification method, polymerase chain reaction, DNA amplification, *Serratia mercescens*, infection control nursing